

10/609358 7.25'3

FOR

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Mai 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/36794 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12P 7/00,  
1/00 // C12N 9/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/04107

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. Oktober 2001 (27.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 54 082.1 31. Oktober 2000 (31.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich (DE).

(71) Anmelder (nur für US): STECKHAN, Christiane (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Uwe (Erbe des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Antje (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE). STECKHAN, Heike (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Jungholzweg 26, 53340 Meckenheim (DE).

(72) Erfinder: STECKHAN, Eberhard (verstorbene).

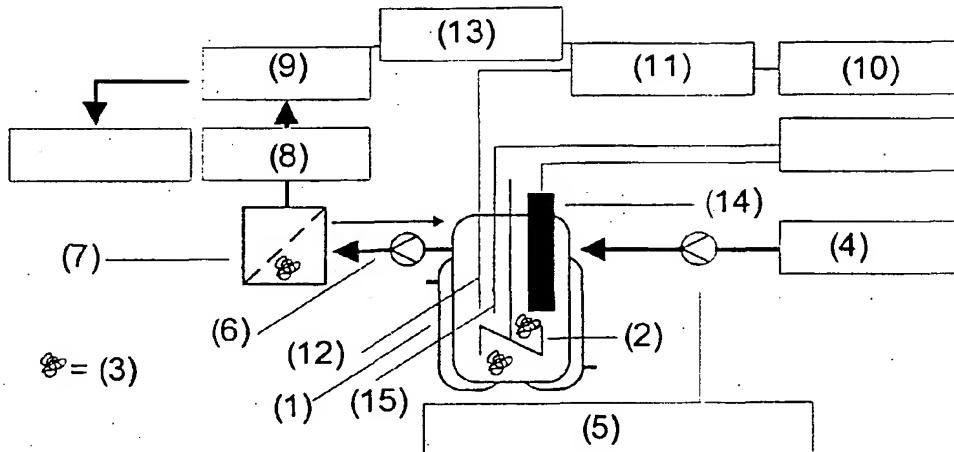
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÜTZ, Stephan [DE/DE]; An Haus Vendel, 50321 Brühl (DE). WANDREY, Christian [DE/DE]; Wolfshovener Straße 139,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMIC OXIDATION OF SUBSTRATES USING H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN OXIDATION VON SUBSTRATEN MIT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



(57) Abstract: The invention relates to a method for the enzymatic oxidation of substrates. When converting organic substrates using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by means of enzymes, the enzymes are deactivated during the course of the conversion by the aggressive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The invention therefore relates to a method for the enzymatic oxidation of substrates, which is characterised in that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> required for the conversion is produced electrochemically. Surprisingly, the enzyme is not deactivated by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during this method, nor even if the stationary concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> corresponds to that produced by conventional methods. The invention also relates to a device for carrying out said method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten. Bei der Umsetzung von organischen Substraten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Enzymen besteht das Problem, dass die Enzyme im Reaktionsverlauf durch das aggressive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deaktiviert werden. Es wird daher erfindungsgemäß ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten zur Verfügung gestellt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass das für die Reaktion notwendige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf elektrochemischem Wege hergestellt wird. Überraschenderweise unterliegt das Enzym bei diesem Verfahren keiner Desaktivierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und zwar auch dann nicht, wenn die stationäre Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derselben Konzentration entspricht, welche durch konventionelle Verfahren herbeigeführt wird. Eine Vorrückung zur Durchführung des Verfahrens ist in Figur 1 angegeben.

**WO 02/36794 A1**



52428 Jülich (DE). **LIESE, Andreas** [DE/DE]; Brock-müllersstrasse 15, 52428 Jülich (DE).

(74) **Gemeinsamer Vertreter:** FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Personal und Recht-Patente (PR-PT), 52425 Jülich (DE).

(81) **Bestimmungsstaat (national):** US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

## B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten  
mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

5        Bei der oxidativen Synthese insbesondere von organischen Zielverbindungen werden Substrate häufig mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Bei diesen Reaktionen werden auch Katalysatoren eingesetzt, welche zu Produkten der gewünschten Regio- oder Stereoselektivität führen. Bei der stereoselektiven organischen Synthese spielen insbesondere Enzyme als Katalysatoren eine wichtige Rolle.

10      Sulfoxide sind zum Beispiel wertvolle chirale Bausteine, die durch katalytische Synthese hergestellt werden können. Sie können in einer Vielzahl asymmetrischer, chemischer Synthesen als chirales Auxiliar oder dirigierende Gruppe eingesetzt werden. Ebenso können sie Bestandteil von Wirkstoffen in der Pharmazie sein.

15      Chemische Synthesen für chirale Sulfoxide sind bereits zahlreich beschrieben (Kagan, H. et al. (1990), Synlett 11: 643-650). Wie allgemein in der Herstellung chiraler Verbindungen, sind auch zur Synthese von Sulfoxiden Biotransformationen eingesetzt worden (Holland, H. et al. (1999), J. Mol. Catal. B. 6: 463-471), insbesondere Haloperoxidinasen: z. B. vanadiumhaltige Bromoperoxidinasen

(Allenmark, S. et al. (1998), Tetrahedron 54: 15293-15304; Allenmark, S. et al. (2000), Biocatalysis and Biotransformation 18: 79-86). Wegen ihrer Selektivität interessant ist Chloroperoxidase aus Leptothrix fumago. So setzt sie im Gegensatz zu anderen Peroxidasen Arylalkylsulfide bevorzugt zum (*R*)-Sulfoxid um, während andere Peroxidasen das (*S*)-Produkt bilden (Allenmark et al. (1996), Tetrahedron: Asymmetry 7: 1089-1094; Sheldon, R. (1997), Tetrahedron 53: 13813-13220). Hierbei werden mit einer Reihe von Arylalkylsulfiden und Alkylalkylsulfiden hohe Ausbeuten und hohe optische Reinheiten erzielt.

Ein großes Problem bei allen bisher bekannten Umsetzungen mit Chloroperoxidase und anderen enzymatischen und nicht enzymatischen Katalysatoren ist jedoch deren rasche Desaktivierung durch das Oxidationsmittel. Meistens wird hierbei Wasserstoffperoxid verwendet. Die Reaktionsparameter sind bereits für die Oxidation verschiedener Sulfide mittels Chloroperoxidase optimiert worden (Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288). Nach der Verfahrensweise von Deurzen bietet es sich an, bei einem pH-Wert von 5 (Kaliumphosphat-Puffer 100 mM) und einer Temperatur von 25 °C zu arbeiten. Es werden 30 Volumen-% tert-Butanol als Cosolvans verwendet. Für ein kontinuierliches Verfahren wird hierbei eine sensorgesteuerte Wasserstoffperoxid-Dosierung verwendet, die eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 50 μM ermöglicht.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse einer zeitabhängigen Aktivitätsmessung der Chloroperoxidase in einem für die

Sulfoxidation relevanten Puffersystem bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von nur 50  $\mu\text{M}$  unter den von Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288, beschriebenen Bedingungen.

5

Bedingt durch die rasche Desaktivierung des Enzyms im o.g. Puffersystem konnten zwar Umsetzungen durchgeführt werden, jedoch mit einer geringen Reaktionsstabilität des Biokatalysators. Die Reaktionsstabilität kann als maximale Zykluszahl angegeben werden ( $t_{tn}$ , engl. total turnover number = Stoffmenge Produkt / Stoffmenge verbrauchtes Enzym). Einige Ergebnisse zeigt Tabelle 2, für die ebenfalls die Reaktionsbedingungen von Deurzen, M. et al. (1997), Biotechnology & Bioengineering 55: 283-288, gelten.

10 Bekannt ist, daß zur Erhöhung der Reaktionsstabilität eine in situ Erzeugung von Wasserstoffperoxid beiträgt. Hierzu sind zwei Ansätze bekannt. Zum einen ein Verfahren, bei dem Sauerstoff mit chemischen Mitteln reduziert wird (Sheldon, R. et al. (1999), J. Mol. Catal. B 6: 453-461), wobei jedoch stets eine stöchiometrische Menge Nebenprodukt anfällt. Ebenso kann Wasserstoffperoxid durch die Oxidation von Glucose mit Sauerstoff und Glucose Oxidase durchgeführt werden (US Patent 4,284,723); die Enzyme können auch coimmobilisiert werden (Sheldon, R. et al. (2000), Biotechnology and Bioengineering 69: 286-291), was jedoch einen hohen verfahrenstechnischen Aufwand darstellt und ebenso kostenintensive Nebenreaktionen bei leicht erhöhter Stabilität um den Faktor 2 in Kauf nimmt. Bei der

chemischen in situ Erzeugung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird aus stöchiometrischen Gründen stets eine relativ hohe Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet, welche bei empfindlichen Katalysatoren oder Enzymen zu einer schnellen Desaktivierung  
5 führt.

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur katalytischen Oxidation von Substraten mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu schaffen, bei dem die Aktivität des Katalysators  
10 nicht durch das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herabgesetzt wird, die Aktivität des Katalysators also über lange Reaktionszeiträume konstant erhalten bleibt und welches kostengünstig und nicht aufwendig in der Verfahrensweise ist. Als Katalysator im Sinne der Erfindung ist ein Enzym zu verstehen, welches ein Substrat umsetzt. Im weiteren Sinne  
15 ist darunter aber auch ein Mikroorganismus zu verstehen, welcher das Substrat biokatalytisch mittels eines Enzyms umsetzt.

20 Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nunmehr möglich,  
25 Substrate in einer für den Katalysator schonungs- vollen Weise mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu oxidieren. Das Verfahren ist kostengünstig, da auf teure Oxidationsreagenzien verzichtet werden kann. Auf viele Verfahrensschritte kann verzichtet werden; da keine Nebenprodukte gebildet werden,  
30 die abgetrennt werden müssen.

Die Figur und die Tabellen zeigen eine mögliche Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens sowie einige Beispiele für den Stand der Technik und erfindungsgemäße Parameter und Ergebnisse.

5

Es zeigt:

Fig.1: Eine Vorrichtung  
Fig.2: Graphik zum Aktivitätsverlauf nach dem Stand der Technik  
10 Fig.3: Umsatz- bzw. Aktivitätsverlauf für Beispiel 1.  
Fig.4: Umsatz-Zeitverlauf für Beispiel 2  
Fig.5: Umsatz-Zeitverlauf für Beispiel 3  
Fig.6: Vergleich der ttn-Werte zum Stand der Technik für kontinuierliche Reaktionen nach Beispiel 3  
15 Tabelle 1: Aktivitäts-Zeitverlauf nach dem Stand der Technik  
Tabelle 2: Restaktivität für verschiedene Verfahrenstypen nach dem Stand der Technik  
20 Tabelle 3a: Liste der Reste  $R_1$  und  $R_2$  für ein erfindungsgemäßes Substrat der allgemeinen Formel  $R_1-S-R_2$   
Tabelle 3b: Substrate, welche durch Chloroperoxidase epoxidiert werden.  
25 Tabelle 3c: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Anwesenheit von Halogenidionen.

Tabelle 3d: Beispiele für Substrate bei der chlo-  
roperoxidasekatalysierten Reaktion bei  
Abwesenheit von Halogenidionen.

Tabelle 4: Versuchsergebnisse

5 Tabelle 5: Versuchsergebnisse

Tabelle 6: Versuchsergebnisse

Tabelle 7: Versuchsergebnisse

Im Folgenden soll die Erfindung erläutert werden:

10

Figur 1 zeigt eine für die Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung. Sie besteht aus einem Reaktor 1, der mit einem Rührer 2 ausgestattet ist und in dem sich die Reagenzien und der Katalysator 3 befinden. Der Re-  
15 aktor 1 besitzt einen Substratzufluss 4, der über eine Regeleinheit 5 gesteuert ist und einen Abfluss 6, der über ein Membranfilter 7 in eine Blasenfalle 8 führt, die mit einem Polarimeter 9 in Verbindung steht, wel-  
ches als Meßinstrument für die Ausbeute der Reaktion  
20 dient. Der Reaktor 1 wird durch einen Sauerstoffvorrat 10 gespeist, der mit einem Massenflußmesser 11 über eine Leitung 12 mit dem Reaktor 1 verbunden ist. Das  
Polarimeter 9 und der Massenflußmesser 11 sind mit  
einer Datenverarbeitungsanlage 13 verbunden. In den  
25 Reaktor 1 ragen eine Kathode 14 und eine Gegenelektrode 15, die einen Stromeintrag in den Reaktor 1 bewirken.  
Durch die gezielte Steuerung der Stromstärke kann eine  
genau an die jeweils vorliegenden Synthesebedingungen  
angepaßte  $H_2O_2$ -Produktionsgeschwindigkeit erreicht wer-  
den. Die stationäre Konzentration an  $H_2O_2$  ist daher von  
30 Anfang an gering, insbesondere dann, wenn die Oberflä-

che der Kathode großflächig ausgebildet ist, so daß die räumliche Verteilung des gebildeten  $H_2O_2$  von Anfang an sehr groß ist. Im Gegensatz zur konventionellen Zudosierung von  $H_2O_2$  in konzentrierten oder bereits ver-  
5 dünnnten Lösungen entsteht in keinem Zeitpunkt eine stationäre und oder punktuelle Konzentration, die so hoch ist, daß das Enzym oder der Mikroorganismus, welcher die Umsetzung durchführt, desaktiviert werden kann.  
Weiterhin wird der Reaktionsprozeß durch das ständige  
10 Rühren begünstigt.

Figur 2 zeigt den Zeitverlauf der Aktivität in % für ein Reaktionssystem gemäß Tabelle 1 nach dem Stand der Technik mit  
15 30% tert.-Butanol: Puffergemisch  $t_{1/2} = 36 \text{ min}^{-1}$   $[H_2O_2] = 50\mu\text{M}$ . Desaktivierungsrate  $1,8\%\text{min}^{-1}$ .  
Abszisse x: Aktivität [%] Chloroperoxidase (CPO)  
Ordinate y: [t/min]

20 Figur 3 zeigt das Ergebnis für das erfindungsgemäße Beispiel 1:  
Ordinate x: Umsatz • von Thioanisol;  
Aktivität o von CPO in [%]  
Abszisse y: Zeit [min]

25 Figur 4 zeigt das Ergebnis für Beispiel 2:  
Abszisse x: Umsatz [%] von Thioanisol  
Ordinate y: Zeit [h]

Figur 5 zeigt das Ergebnis für Beispiel 3:

Abszisse x: Umsatz [%] von Thioanisol

Ordinate y: Zeit [h]

5 Figur 6 zeigt das Ergebnis für Tabelle 5:

Abszisse x: ttn [ $10^3$ ]

Ordinate y: ttn Werte links Stand der Technik,  
rechts erfindungsgemäß

10 Erfindungsgemäß wird nun bei einer katalytischen Oxida-  
tion eines Substrates Sauerstoff in die Lösung einge-  
leitet, welcher durch die Kathode zu  $H_2O_2$  reduziert  
wird. Die elektrochemische Herstellung des  $H_2O_2$  muß  
nicht zwingend im Reaktor 1 erfolgen, sondern kann auch  
15 außerhalb des Reaktors stattfinden, wobei das gebildete  
 $H_2O_2$  anschließend in den Reaktor 1 eingeleitet wird,  
jedoch ist die  $H_2O_2$ -Herstellung im Reaktor 1 bevorzugt.  
Erfindungswesentlich ist hierbei, daß das  $H_2O_2$  in einer  
solchen Konzentration gebildet wird, bzw. in einer sol-  
20 chen Konzentration vorliegt, daß ein gegenüber  $H_2O_2$   
empfindlicher Katalysator nicht desaktiviert wird. Dies  
ist in der Regel dann der Fall, wenn die Elektrolyse  
mit  $H_2O_2$ -Produktionsraten durchgeführt wird, die gerin-  
ger oder gleich sind als die Menge  $H_2O_2$ , die der Kata-  
25 lysator umsetzen kann. In dieser bevorzugten Verfah-  
rensweise ist die Produktionsrate von  $H_2O_2$  maximal so  
hoch, wie es dem  $K_m$ -Wert des Biokatalysators für die  
spezifische Reaktion entspricht. Beispielhaft können  
Reaktionsbedingungen angegeben werden, bei denen eine  
30 Graphitelektrode einer Oberfläche von 6 cm<sup>2</sup> eine Strom-

dichte von  $0,1\text{-}5 \text{ mAcm}^{-2}$ , oder  $0,3\text{-}1,0 \text{ mAcm}^{-2}$  und bei CPO von  $0,5 \text{ mAcm}^{-2}$  in das Reaktionssystem einträgt. Diese Werte sind jedoch nicht beschränkend auszulegen, da die für den Spezialfall günstigste Stromdichte von einer Vielzahl von Parametern, wie Konzentration der Einzelkomponenten und damit der Geschwindigkeit der Umsetzung und der Instabilität des Enzyms gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  abhängt. Im Allgemeinen gilt jedoch, daß die Elektrolyse am Besten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktionsraten durchgeführt wird, die geringer oder gleich sind als die Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die der Katalysator umsetzen kann. Bei der Sulfoxidation kann von einem  $K_m$ -Wert von  $< 100 \mu\text{M}$  ausgegangen werden.

Empfindliche Katalysatoren im Sinne der Erfindung sind Enzyme, die in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  deaktiviert werden. Beispiele hierfür sind Oxidoreduktasen, wie Peroxidasen, NADH -Peroxidase (1.11.1.1.), NADPH-Peroxidase (1.11.1.2.), Fatty acid peroxidase (1.11.1.3.), Myeloperoxidase (1.11.1.7.), Glutathione peroxidase (1.11.1.9.), L-ascorbate peroxidase (1.11.1.11.), Mangan Peroxidase (1.11.1.13) (die Numerierung entspricht der CPO-Nomenklatur (1.11.1.10), besonders bevorzugt die Haloperoxidasen, Chloroperoxidasen, Bromoperoxidasen, Jodoperoxidasen).

In dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem können sich auch zwei oder mehrere Katalysatoren bzw. Enzyme befinden, die nebeneinander ablaufende oder in einer Nachfolge ablaufende Reaktionen katalysieren. Die Katalysatoren können sowohl frei in der Lösung vorliegen, als auch an Festphasen immobilisiert sein. Nach dem Stand der Technik wird die Immobilisierung häufig dann ver-

wendet, wenn ein Katalysator bzw. Enzym kinetisch anfällig gegen Desaktivierung ist, zum Beispiel bedingt durch chemische Reaktion des Katalysators mit einer der im System befindlichen Komponenten. Das erfindungsge-  
5 mäße Verfahren trägt dazu bei, daß auf eine Immobili-  
sierung an einem Festkörper verzichtet werden kann, zu-  
mindest um den Katalysator vor Desaktivierung zu schüt-  
zen. Es kann jedoch aus anderen verfahrenstechnischen  
Gründen vorteilhaft sein, eine Immobilisierung an einer  
10 Polymermatrix vorzunehmen, da eine Zurückgewinnung des  
Katalysators so leichter möglich ist.

Die enzymatischen Umsetzungen werden in wäßriger Lösung durchgeführt; jedoch können zur Steigerung der Sub-  
15 stratlöslichkeit, insbesondere von organischen Substra-  
ten, organische Lösungsmittel als Cosolventien einge-  
setzt werden, die in Konzentrationen von beispielsweise  
1 bis 50% oder vorzugsweise 10 bis 30%, besonders be-  
vorzugt 15%, eingesetzt werden können. Beispielhaft  
20 können Lösungsmittel wie tert.-Butanol, PEG 600,  
2-Butanon, Ethylenglykol, 2-Propanol, Aceton, Ethanol,  
2-Butanol, PEG 20000, Ethylenglycolmonobutylester ge-  
nannt werden.

25 Die Reaktionsbedingungen für enzymatische Katalysen werden vorzugsweise so gewählt, daß ein pH-Wert von 3-8 vorliegt. Besonders bevorzugte pH-Werte liegen bei 4,5-  
5,5.

Die günstigsten Reaktionsbedingungen finden sich in einem Temperaturbereich zwischen 5 und 30 °C, besonders bevorzugt sind Reaktionstemperaturen zwischen 15 und 25 °C.

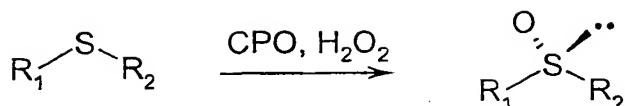
5

Als Substrate können in den Reaktionen die, für die Katalysatoren, entsprechenden Substrate eingesetzt werden. Diese sind grundsätzlich nicht auf einzelne Beispiele beschränkt, jedoch sind in den Tabellen 3a bis d 10 beispielhaft einige Substrate angeführt, die für die Reaktionen eingesetzt werden können. Diese beispielhaft aufgeführten Substrate können zum Beispiel für Reaktionen mit Peroxidasen, allgemeiner Oxidoreduktasen, eingesetzt werden. Natürlich können sie auch bei Enzymreaktionen anderer Enzyme eingesetzt werden, die diese 15 Substrate umsetzen.

Generell kommen organische Substrate, wie Sulfide, Olefine, Olefinester, aromatische Olefine, Alkine, Cyclopropan, substituiertes Cyclopropan, Sulfoxide, Thiole, Carbonsäuren, Heteroaromaten, Aromaten, halogensubstituierte Aromaten, Phenole, o-, m-, p-alkylsubstituierte Phenole, Anilin, N-Di oder monoalkylsubstituiertes Anilin oder Alkohole in Betracht.

25

In einem Ausführungsbeispiel gemäß Formel 1 kann die stereoselektive Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden mittels Chloroperoxidase (E.C.1.11.1.10), die nach einer anderen Nomenklatur mit CAS [9055-20-39] bezeichnet wird, beschrieben werden.



Formel 1

$\text{R}_1$  = eine Komponente aus der Gruppe Alkyl, Aryl, Phenyl, alkylsubstituiertes Aryl (Tolyl), halogensubstituiertes Aryl- (m-Chlorphenyl, p-Chlorphenyl, m-Bromo-phenyl-, p-Bromophenyl), m-Methoxyphenyl, p-Methoxyphenyl, p-Nitrophenyl, heterosubstituiertes Aryl (5,6,7-gliedrige aromatische Ringe mit O,S,N, z. B.

10 Thiophen)

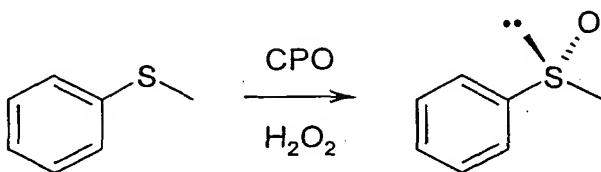
$\text{R}_2$  = eine Komponente aus der Gruppe Alkyl (Methyl, Ethyl, n-Propyl)

Die Substrate können einer Formel aus allen Unterkombinationen von  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  entsprechen oder Verbindungen sein, bei denen  $\text{R}_1 = \text{R}_2$  ist, oder Substrate sein, bei denen  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Bestandteil eines cyclischen Systems (z.B. Thiochroman, 2,3-Dihydro [b]Benzothiophen) ist.

Unter Alkyl sind sowohl für  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  geradkettige als auch verzweigte Kohlenwasserstoffketten zu verstehen, wobei die Komponenten auch mit Heteroatomen, wie z. B. O, N, F, Cl, Br und I substituiert sein können. Beispieldhaft können Methyl, Ethyl, n-Propyl, i-Propyl, t-Butyl genannt werden.

Unter Aryl sind aromatische Systeme, eingeschlossen Heteroaromaten, und substituierte aromatische Systeme zu verstehen.

Beispielhaft kann eine Umsetzung nach Formel 2 angeführt werden.



5

Formel 2

Überraschend hat sich gezeigt, daß die Chloroperoxidase aus Leptoxiphyllum fumago (E.C. 1.11.1.10) entgegen allen bisherigen Experimenten in der Lage ist, kontinuierlich Oxidationen von Sulfiden durchzuführen, wenn die Bereitstellung des Oxidationsmittels erfindungsgemäß durch kathodische Reduktion von Sauerstoff erfolgt. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine bequeme Einstellung der Dosierrate über die Stromdichte, und als Nebenprodukt fällt ausschließlich Wasser an. Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher insbesondere kostengünstig und umweltfreundlich.

Chloroperoxidase ist z. B. in der Lage, Thioanisol (Methylphenylsulfid) bei einer Limitierung der Wasserstoffperoxid-Dosierung durch das erfindungsgemäße Verfahren in einer Konzentration von 3,7 g/L Thioanisol (=20 mM) in einem Volumen von 50 mL innerhalb von 5 Stunden vollständig umzusetzen.

Das Verfahren kann in den üblichen Reaktoren durchgeführt werden, die zusätzlich mit einer Elektrodenanordnung und einer Sauerstoffbegasung versehen sind. So

können z. B. herkömmliche Rührreaktoren in diskontinuierlicher oder kontinuierlicher Betriebsweise eingesetzt werden.

Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens vermindert sich der kostenintensive Katalysatorverbrauch deutlich.

Werden als Biokatalysatoren Mikroorganismen eingesetzt, die die Oxidation des Substrates durch eine enzymatische Reaktion durchführen, so ist es gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls vorteilhaft, daß der Mikroorganismus nicht durch  $H_2O_2$  angegriffen wird. In dem Mikroorganismus kann das Enzym überexprimiert sein.

15

Im folgenden wird die Erfindung anhand von speziellen Beispielen näher beschrieben:

Beispiel 1 : Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im Rührreaktor

Chloroperoxidase wurde käuflich erworben (z. B. Sigma C-0287), in Puffergemisch gelöst (Kaliumphosphat 0,1 M; pH 4,5; 30 Vol% t-BuOH), Thioanisol zugegeben, die Lösung mit Sauerstoff begast und die Umsetzung durch Elektrolyse gestartet.

Ansatz: 5 mL Reaktionsvolumen

0,1 mmol Thioanisol

15 U Chloroperoxidase (0,28 nmol)

Nach 10, 20, 35 und 55 Minuten wurden jeweils Proben entnommen und mittels gaschromatographischer

(GC-) Analyse der Gehalt an restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt (Fig. 3).

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

5 Kapillarsäule: HPI (Länge 12 m, Ø=0,25 mm), Trägergas: Stickstoff, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur: 60 °C (0,5 min), 20 °C·min<sup>-1</sup>, 200 °C (2 min)

10 Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß das eingesetzte Sulfid nach 40 Minuten praktisch vollständig zum Sulfoxid umgesetzt worden ist.

15 Nach der Umsetzung wurden noch 73% Enzymaktivität wiedergefunden, was einer ttn von 360.000 entspricht (Faktor 2,4 gegenüber bekannten Verfahren).

Beispiel 2 : Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im Rührreaktor mit Produktextraktion im repetitive batch

Verfahren gemäß Beispiel 1. Nach vollständiger Umsetzung wird das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, neues Substrat zugegeben und die Elektrolyse fortgesetzt.

Ansatz: 50 mL Reaktionsvolumen  
4\*1 mmol Thioanisol  
50 U Chloroperoxidase (0,93 nmol)

30 Die Elektrolyse wird nach entsprechendem Ladungsfluß unterbrochen, Proben entnommen und mittels gaschroma-

tographischer (GC-) Analyse der Gehalt an restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt. Die verschiedenen Versuchsläufe sind in Fig. 4 dargestellt. Der Ladungsfluß pro Lauf betrug 193 C (Coulomb).

5

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

Kapillarsäule: HP1 (Länge 12 m, Ø=0,25 mm), Trägergas: Stickstoff, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur: 60 °C (0,5 min),  
10 20 °C·min<sup>-1</sup>, 200 °C (2 min)

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß das jeweils eingesetzte Sulfid nach maximal 360 Minuten praktisch vollständig zum Sulfoxid umgesetzt worden ist.

Zwischen Lauf 2 und Lauf 3 war die Reaktion unterbrochen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnte eine enorme Stabilitätssteigerung der Chloroperoxidase erreicht werden (Umsetzung über 29 Stunden), wobei eine ttn von 1.100.000 erreicht werden kann (Faktor 7 gegenüber bekannten Verfahren).  
20

Beispiel 3: Oxidation von Thioanisol mit Chloroperoxidase und elektrochemisch generiertem Wasserstoffperoxid im kontinuierlichen Rührreaktor

Chloroperoxidase wurde käuflich erworben (z. B. Sigma C-0287), in Puffergemisch gelöst (Kaliumphosphat 0,1 M; pH 4,5; 30 Vol% t-BuOH), Thioanisol zugegeben, die Lösung mit Sauerstoff begast und die Umsetzung durch  
30

Elektrolyse (Arbeitselektrode Graphit ( $9 \text{ cm}^2$ ), galvanostatisch  $0,4 \text{ mA/cm}^2$ ) gestartet. Der hierzu verwendete Reaktor ist in Figur 1 skizziert.

5 Ansatz: 50 mL Reaktorvolumen  
1L 20 mmol Thioanisol in Puffergemisch  
400 U Chloroperoxidase (7 nmol)

Der Reaktorauslauf wird fraktioniert gesammelt und mittels gaschromatographischer (GC-) Analyse der Gehalt an 10 restlichem Substrat und an Sulfoxid ermittelt.

Analysebedingungen für die Gaschromatographie:

Kapillarsäule : Cyclodex  $\beta$ -1P (Länge 50 m,  
 $\varnothing = 0,32 \text{ mm}$ ), Trägergas: Helium, Injektor: Split,  
15 200 °C, Detektor: FID, 250 °C, Säulentemperatur 40 °C  
(5 min),  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , 160 °C (5 min)

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse dieser Analytik. Daraus geht hervor, daß nach der Anlaufphase ein kontinuierlicher Umsatz von ~ 50 % erreicht wird.  
20

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten kontinuierliche Umsetzungen über einen Zeitraum von 65 Stunden durchgeführt werden, was gegenüber der anfangs (Tab. 1) 25 gezeigten starken Desaktivierungsrate eine erhebliche Verbesserung darstellt. Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet zum ersten Mal eine kontinuierliche stereoselektive Oxidation von Sulfiden mit Chloroperoxidase ohne signifikante Desaktivierung. Die Reaktionsstabilität (ttn 260.000) konnte um den Faktor 14 gegenüber 30

kontinuierlichen Verfahren mit herkömmlicher Dosier-technik gesteigert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können stationäre Konzentrationen von weniger als 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugt werden. Auch wenn die in die Reaktionslösung eingetragene Ladungsmenge zu einer stationären Konzentration von 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt, die nach dem Stand der Technik ebenfalls erreicht wird, ist die Desaktivierung des Enzyms unterbunden, so daß für das erfindungsgemäße Verfahren, selbst bei gleicher stationärer Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wie bei dem Stand der Technik, ein besseres Ergebnis, das heißt keine Desaktivierung des Enzyms beobachtet wird.

Die Verbesserungen durch diese neue Methode sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die stereoselektive Synthese von organischen Verbindungen geeignet, da mit ihm die Ausbeute an enantiomerenreinem Produkt nicht gemindert wird, und der Vorteil der enzymatischen Reaktion gegenüber anderen nicht enantioselektiven Methoden erhalten bleibt. Es kann somit bevorzugt zur Synthese chiraler Produkte und anderer Wertstoffe eingesetzt werden.

Tabelle 1: Zeitabhängige Aktivitätsbestimmung der Chloroperoxidase bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$

Zeit (min)	rel. Aktivität (%)
0	100
10	79,2
20	73,6
30	56,8
40	52,8
50	36,8
60	27,2

Tabelle 2: Reaktionsstabilität der Chloroperoxidase für die Sulfoxidation

Reaktionsführung	ttn	Restaktivität
Batch	148.000	5 %
Fed-Batch	145.000	0 %
kontinuierlich	19.200	-

Tabelle 3a: Liste der Reste R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> für ein erfundengemäßes Substrat der allgemeinen Formel R<sub>1</sub>-S-R<sub>2</sub>

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	cyclisches Sulfid
	CH <sub>3</sub>		CH <sub>2</sub>	
	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>	
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
MeO	CH <sub>3</sub>		CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
	CH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>	
	CH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>	
O <sub>2</sub> N	CH <sub>3</sub>			
Cl	CH <sub>3</sub>			
Cl	CH <sub>3</sub>			

Tabelle 3b: Substrate, welche durch Chloroperoxidase epoxidiert werden

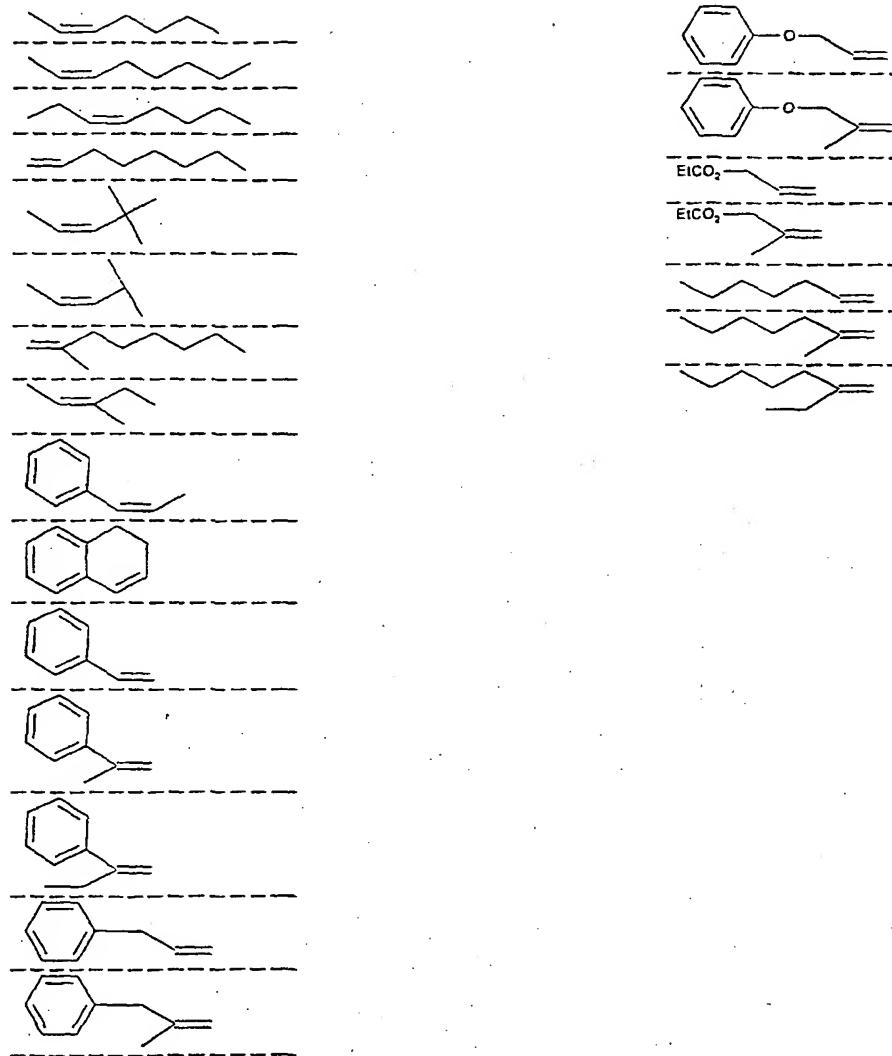


Tabelle 3c: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Anwesenheit von Halogenidionen

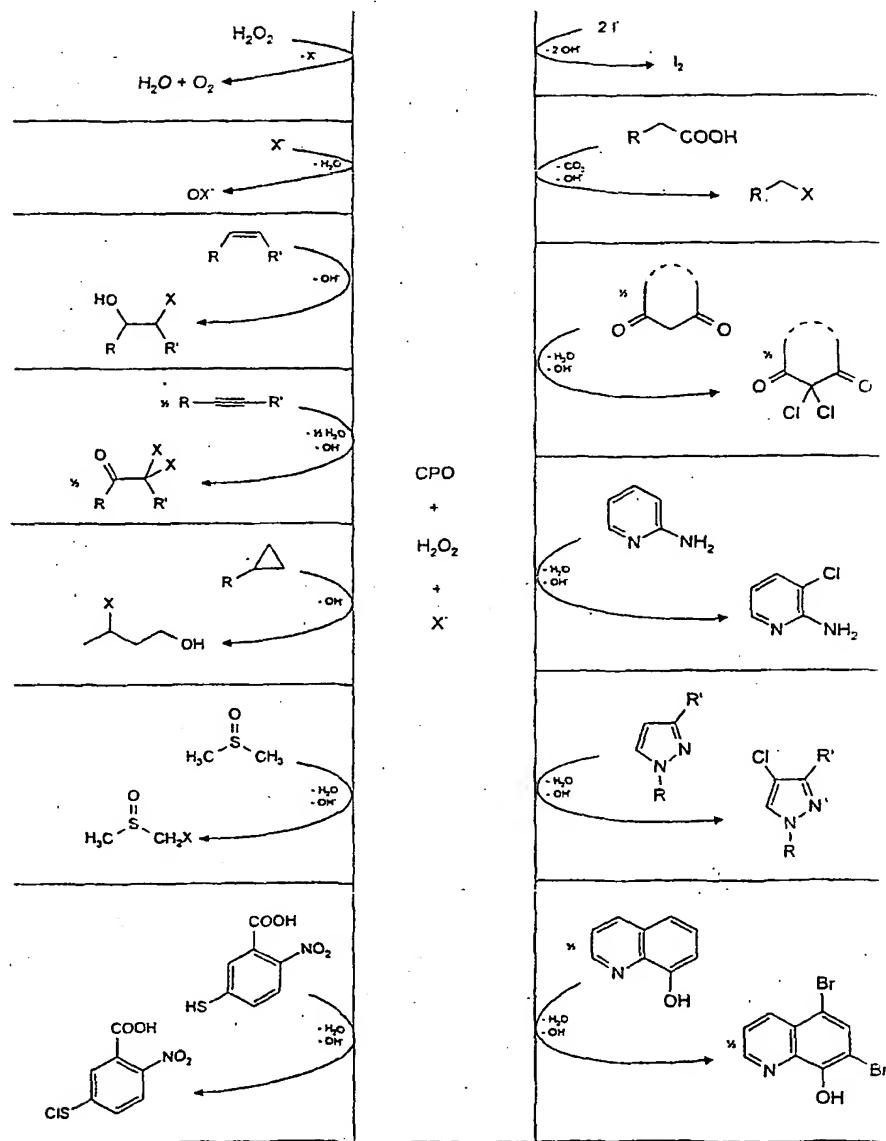


Tabelle 3d: Beispiele für Substrate bei der chloroperoxidasekatalysierten Reaktion bei Abwesenheit von Halogenidionen

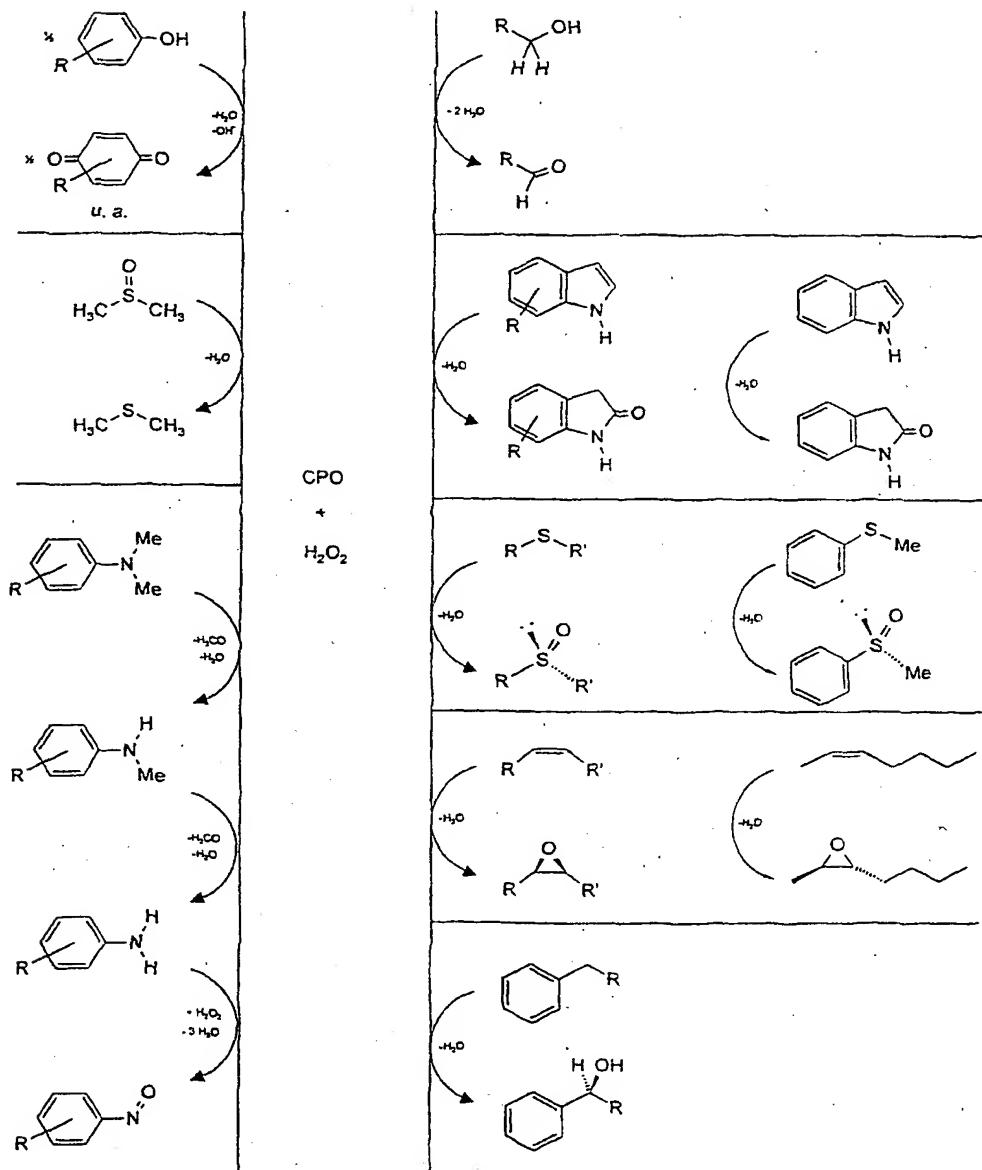


Tabelle 4: Zeitabhängigkeit der Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase

Zeit (min)	Thioanisol (%)	Methylphenylsulfoxid (%)
0	100	0
10	68	32
20	56	44
35	15	85
55	0	100

Tabelle 5: Zeitabhängigkeit der Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxidase im repetitive batch

Lauf	Zeit (min)	Thioanisol (%)	Methylphenylsulfoxid (%)
1	0	100	0
	350	15	85
2	400	84	16
	720	5	95
3	1000	92	8
	1270	1	99
4	1400	89	11
	1720	1	99

Tabelle 6: Bildung von Methylphenylsulfoxid bei der Umsetzung von Thioanisol mit Chloroperoxydase im kontinuierlichen Reaktor

Zeit (h)	Thioanisol (%)	Methylphenylsulfoxid (%)
0	100	0
5	65	35
11	47	53
15	45	55
21	48	62
25	47	63
31	47	53
35	50	50
41	45	55
45	49	51
51	46	54
55	30	70
61	33	67
65	52	48

Tabelle 7: Vergleich der kontinuierlichen Verfahren  
zur Sulfoxidsynthese mit Chloroperoxidase

Verfahren	ttn	CPO-Dosierung U /h
herkömmlich	19000	590
Erfindung	260000	0

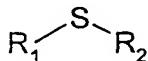
## P a t e n t a n s p r ü c h e

---

1. Verfahren zur enzymatischen Oxidation von Substraten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß das Substrat mittels mindestens eines Katalysators mit auf elektrochemischem Wege erzeugtem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der ein Enzym beinhaltet.
3. Verfahren nach Anspruch 2,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß als Enzym eine Oxidoreduktase eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3;  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß als Oxidoreduktase eine Peroxidase eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 daß als Peroxidase eine Haloperoxidase eingesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Haloperoxidase mindestens eine Komponente  
aus der Gruppe Chloroperoxidase, Bromoperoxidase  
und Jodoperoxidase eingesetzt wird.  
5
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Chloroperoxidase (E.C.1.11.1.10) aus *Lepto-*  
10 *xiphium fumago* eingesetzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Substrat ein organisches Substrat einge-  
15 setzt wird.  
15
9. Verfahren nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als organisches Substrat eine Komponente aus  
20 der Gruppe der Sulfide, Olefine, Olefinester, aro-  
matische Olefine, Alkine, Cyclopropan, substituiertes  
Cyclopropan, Sulfoxide, Thiole, Carbonsäuren,  
Heteroaromaten, Aromaten, halogensubstituierte Aro-  
matten, Phenole, o-, m-, p-alkylsubstituierte Phenole,  
25 Anilin, N-Di oder monoalkylsubstituiertes Anilin o-  
der Alkohole eingesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Substrat ein Sulfid der Formel 1



eingesetzt wird, bei dem  $\text{R}_1$  Alkyl oder Aryl, Heteroaryl, substituiertes Aryl ist und  $\text{R}_2$  Alkyl ist.

10 11. Verfahren nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Alkylrest ein Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-,  
i-Propyl-, t-Butylrest ist.

15 12. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Alkylrest durch Heteroatome wie O, N, F,  
Cl, Br, und J substituiert ist.

20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch kathodische Reduktion *in situ* erzeugt  
wird.

25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Produktionsgeschwindigkeit höchstens so  
hoch ist, wie es dem  $K_m$ -Wert des Biokatalysators  
entspricht.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reaktion bei einem pH-Wert zwischen 3 und 8  
durchgeführt wird.

5

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Reaktionslösung ein organisches Lösungsmittel  
beigemischt ist.

10

17. Verfahren nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als organisches Lösungsmittel tert.-Butanol  
verwendet wird.

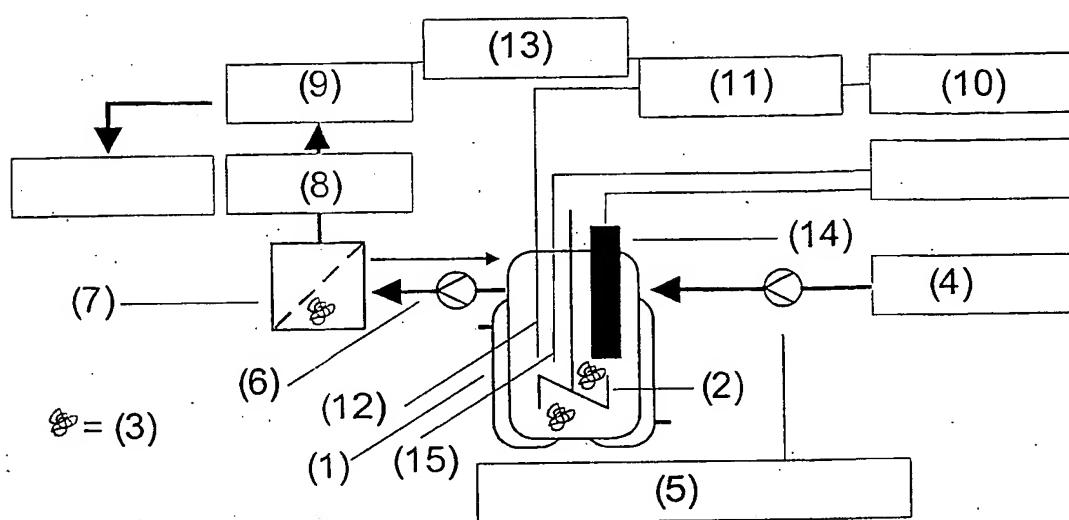
15

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reaktion bei einer Temperatur von 5 bis  
30 °C durchgeführt wird.

20

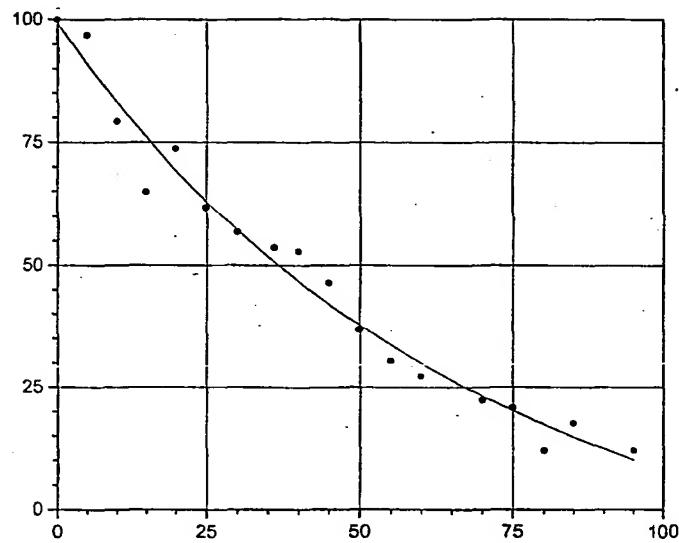
19. Verfahren nach Anspruch 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reaktion bei einer Temperatur von 15 bis  
25 °C durchgeführt wird.

1/4

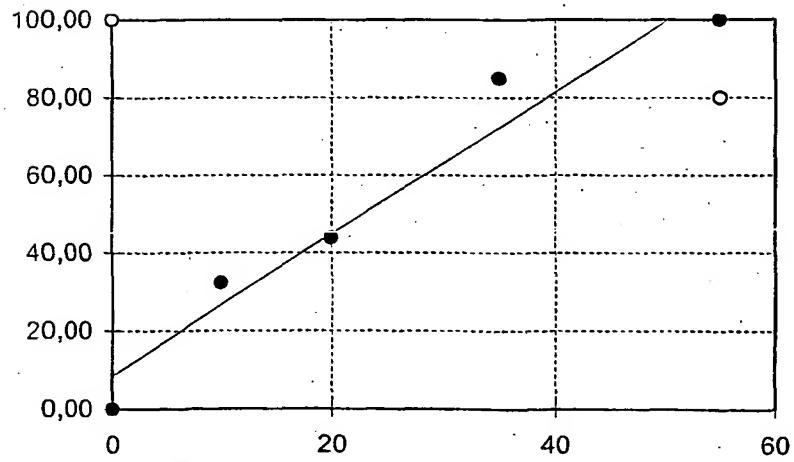


Figur 1

2/4

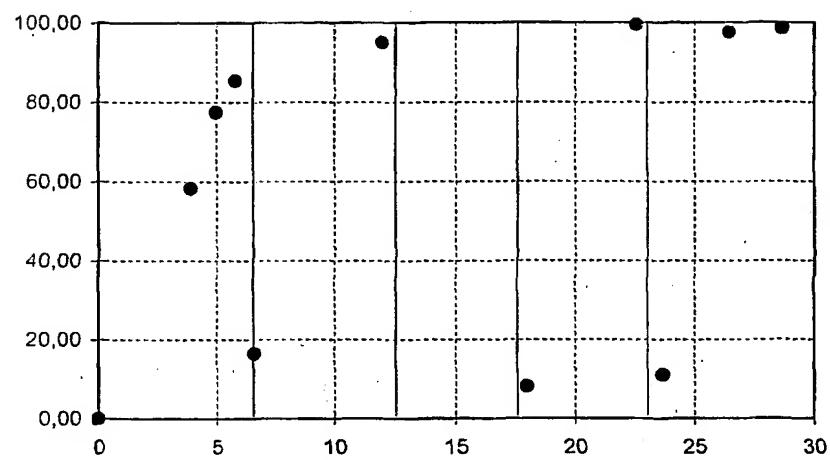


Figur 2

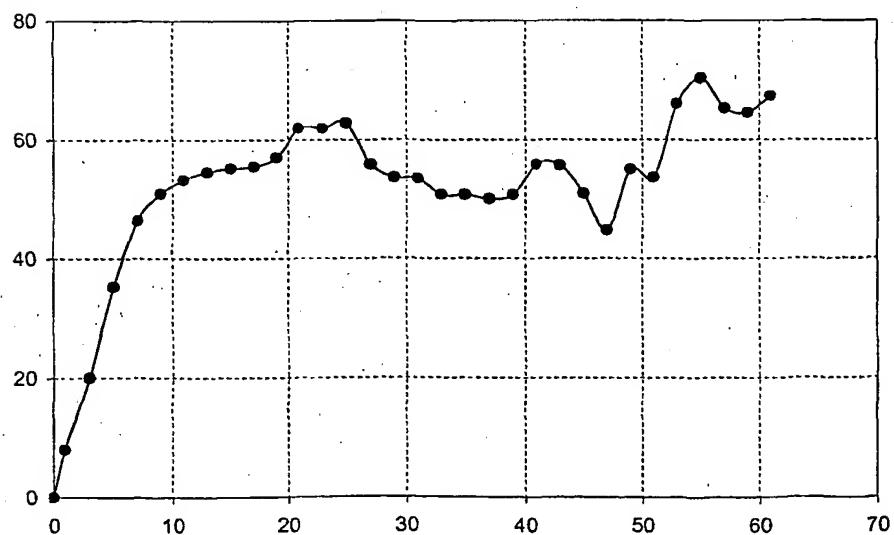


Figur 3

3/4

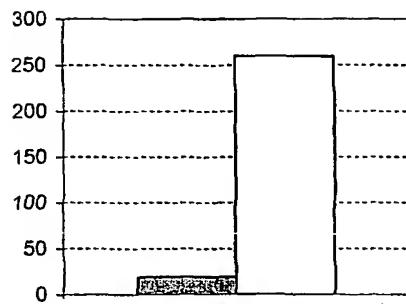


Figur 4



Figur 5

4/4



Figur 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/DE 01/04107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P7/00 C12P1/00 //C12N9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTLETT, PN ET AL.: "Approaches to the Integration of Electrochemistry and Biotechnology II. The Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Electrogenerated Hydrogen Peroxide" JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, vol. 146, no. 3, 1999, pages 1088-1092, XP002191300 page 1090 -page 1092 the whole document ---	1-4
Y	----- -/-	5-19

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 2002

Date of mailing of the international search report

04/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In	Application No
PCT/DE 01/04107	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN JK & NOBE K: "Oxidation of Dimethylaniline by Horseradish Peroxidase and Electrogenerated Peroxide. I. Free Enzyme Studies" J ELECTROCHEM SOC, vol. 140, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 299-303, XP001064971 the whole document ---	1-4
Y	VAN DE VELDE, F ET AL.: "Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 69, no. 3, 5 August 2000 (2000-08-05), pages 286-291, XP002191301 cited in the application the whole document ---	1-19
Y	SEELBACH, K ET AL.: "Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 55, no. 2, 20 July 1997 (1997-07-20), pages 283-288, XP002191302 cited in the application page 286; table 1 ---	1-19
A	WO 96 06909 A (DEGUSSA ;LAATSCH HARTMUT (DE); SCHRAPEL THOMAS (DE); BERKESSEL ALB) 7 March 1996 (1996-03-07) claims 1-5 ---	1-19
A	COLONNA, S ET AL: "Recent biotechnological developments in the use of peroxidases" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 163-168, XP004162835 ISSN: 0167-7799 the whole document ---	1-19
A	D. PLETCHER: "Electrogenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities" WATTS NEW, A NEWSLETTER FROM ELECTROSYNTHESIS COMPANY, 'Online' vol. 4, no. 1, January 1999 (1999-01), XP002191684 Lancaster, NY, USA Retrieved from the Internet: <URL:www.electrosynthesis.com/news/w7content.html> 'retrieved on 2002-02-28! the whole document -----	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No  
PCT/DE 01/04107

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9606909	A 07-03-1996	DE AU WO EP TR	4430327 C1 3472495 A 9606909 A2 0777718 A2 960173 A2		09-05-1996 22-03-1996 07-03-1996 11-06-1997 21-06-1996

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04107

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes  
 IPK 7 C12P7/00 C12P1/00 //C12N9/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BARTLETT, PN ET AL.: "Approaches to the Integration of Electrochemistry and Biotechnology II. The Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by Electrogenerated Hydrogen Peroxide" JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, Bd. 146, Nr. 3, 1999, Seiten 1088-1092, XP002191300 Seite 1090 -Seite 1092 das ganze Dokument ---	1-4
Y	---	5-19

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu- oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
11. März 2002	04/04/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensleiter  Bucka, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.	als Aktenzeichen
PCT/DE 01/04107	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEN JK & NOBE K: "Oxidation of Dimethylaniline by Horseradish Peroxidase and Electrogenerated Peroxide. I. Free Enzyme Studies" J ELECTROCHEM SOC, Bd. 140, Nr. 2, Februar 1993 (1993-02), Seiten 299-303, XP001064971 das ganze Dokument ---	1-4
Y	VAN DE VELDE, F ET AL.: "Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 69, Nr. 3, 5. August 2000 (2000-08-05), Seiten 286-291, XP002191301 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-19
Y	SEELBACH, K ET AL.: "Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 55, Nr. 2, 20. Juli 1997 (1997-07-20), Seiten 283-288, XP002191302 in der Anmeldung erwähnt Seite 286; Tabelle 1 ---	1-19
A	WO 96 06909 A (DEGUSSA ;LAATSCH HARTMUT (DE); SCHRAPEL THOMAS (DE); BERKESSEL ALB) 7. März 1996 (1996-03-07) Ansprüche 1-5 ---	1-19
A	COLONNA, S ET AL: "Recent biotechnological developments in the use of peroxidases" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 163-168, XP004162835 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument ---	1-19
A	D. PLETCHER: "Electrogenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities" WATTS NEW, A NEWSLETTER FROM ELECTROSYNTHESIS COMPANY, 'Online' Bd. 4, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), XP002191684 Lancaster, NY, USA Gefunden im Internet: <URL:www.electrosynthesis.com/news/w7content.html> 'gefunden am 2002-02-28! das ganze Dokument ---	1-19

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In: nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/04107

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9606909	A 07-03-1996	DE	4430327 C1	09-05-1996
		AU	3472495 A	22-03-1996
		WO	9606909 A2	07-03-1996
		EP	0777718 A2	11-06-1997
		TR	960173 A2	21-06-1996